

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL P16^{INK4A} Y KI 67 EN DIAGNÓSTICO DE LESIONES INTRAEPITELIALES DE CABEZA Y CUELLO INFORME PRELIMINAR

MASSIEL S. FERNÁNDEZ B, EDDY V MORA, WILFREDO PERFFETI C, DANIEL VERDECCHIA, RAMÓN TELLEZ, EMELISSA SOSA

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO", VALENCIA, ESTADO CARABOBO

RESUMEN

OBJETIVO: El p16INK4a ha sido identificado como un biomarcador de infección por VPH y su presencia en conjunto con el Ki 67 ha sido propuesta como una herramienta diagnóstica de lesiones pre invasoras intraepiteliales cervicales. Es conocida la asociación del VPH con algunos tipos de carcinomas epidermoide de cabeza y cuello. El propósito de este estudio fue utilizar la inmunotinción de p16/Ki-67 en el diagnóstico de lesiones intraepiteliales preinvasoras de mucosa de cabeza y cuello. **MÉTODO:** Una serie de 20 lesiones intramucosas provenientes de la cavidad oral y laringe. Utilizamos la técnica de matriz de tejidos y realizamos inmunohistoquímica para p16/Ki-67. **RESULTADOS:** El diagnóstico histológico fue de papilomatosis, hiperplasia escamosa y displasia. Inesperadamente el 60 % fueron de sexo femenino y 40 % masculino. 13 % progresaron a carcinoma escamoso de cabeza y cuello entre un mes y 5 años después del diagnóstico. 13 % expresaron p16/Ki-67. Todos los pacientes positivos para Ki-67 evolucionaron a carcinoma. **CONCLUSIÓN:** La serie es muy pequeña y no permitió encontrar asociación entre p16/Ki-67 con las variables. Los datos sugieren que Ki 67 podría ser utilizado como un biomarcador para el riesgo de desarrollo de carcinoma infiltrante. La utilidad del p16 como biomarcador de infección por VPH debe ser confirmado con métodos moleculares.

PALABRAS CLAVE: p16INK4a, VPH, Ki 67, carcinoma epidermoide, cabeza, cuello, lesiones intramucosas, papilomatosis.

SUMMARY

OBJECTIVE: The p16INK4a has been identified as a biomarker for lesions caused by the HPV, and its presence with Ki-67 immunostains has been proposed as a diagnostic tool for the neoplastic pre invasive lesions. For all is well known the association between the HPV and certain kinds of the head and neck squamous cell carcinoma. The purpose of this study was to determine the use of P16/Ki-67 immunostains in the diagnosis of the neoplastic intramucosal pre invasive lesions of head and neck. **METHOD:** A series 20 biopsies of intramucosal lesions from oral cavity and larynges. We used tissue microarray technique and performed immunostains for P16/Ki-67. **RESULTS:** Histological diagnosis was papillomatosis, squamous hyperplasia and dysplasia. Unexpected 60 % were female and 40 % were man. 13 % evolved to a squamous cell carcinoma between 1 month and 5 years. 13 % express P16/Ki-67 immunostains. All patients positive Ki-67 evolves to head and neck squamous cell carcinoma. **CONCLUSION:** The series is too short; we were not able to find association between the p16/Ki-67 and variables. Data suggests that Ki-67 as biomarker predicting a higher risk of becoming and invasive carcinoma. In addition, the utility of p16 as biomarker of the HPV lesions has to be confirming with the molecular diagnosis.

KEY WORDS: p16INK4a, HPV, Ki 67, head, neck, squamous carcinoma, intra mucosal lesion, papillomatosis.

Recibido: 22/09/2016 Revisado:15/10/2016

Acceptado para publicación: 12/11/2016

Correspondencia: Dra. Edy V Mora. Centro Policlínico
Valencia. Av. Carabobo. Torre B. PB. Consultorio 113.
veroinmuno@mail.com.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) constituye el sexto tumor maligno más común, con una incidencia anual estimada de 633 000 y 355 000 muertes en todo el mundo ⁽¹⁻³⁾.

Las lesiones precursoras son conocidas como alteraciones del epitelio que tienen mayor probabilidad de progresión hacia el CECC. Los términos displasia, neoplasia intraepitelial e hiperplasia epitelial atípica se utilizan casi de manera equivalente. Estas lesiones de potencial maligno implican cambios citológicos y arquitecturales caracterizados por atipias y trastornos de maduración del epitelio de revestimiento de tipo mucoso de la cabeza y el cuello ⁽⁴⁻⁶⁾.

En la actualidad entre los factores de riesgo conocidos se reconoce la participación de la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Los serotipos de alto riesgo (16, 18, 31 y 33), se describen en la literatura mundial en el carcinoma de cuello uterino, otras neoplasias ano-genitales, y en un subgrupo de CECC ⁽³⁾.

En las etapas iniciales de la enfermedad, el paciente puede no mostrar ningún síntoma clínico; y como un número tan significativo de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico (nodal regional participación en 43 % y la metástasis distante en 10 %), lo que lleva a 5 años las tasas de supervivencia de menos de 60 % ⁽⁷⁾.

Tienden a ser altamente curables si se detecta tempranamente. El VPH posee E6 y E7 las cuales codifican las principales oncoproteínas del virus, que promueven la célula a la progresión del ciclo y la replicación del ADN viral. La mayoría de las personas con infección por el VPH no desarrollan cáncer. La expresión de E6 y E7 es necesaria pero no suficiente para transformación maligna ⁽⁷⁾.

Sin embargo, el aumento de la capacidad

proliferativa y la evasión de la apoptosis inducida por la E6 y E7 pueden conducir a la acumulación de daño del ADN y mutaciones que en última instancia, pueden dar lugar a la transformación maligna y la carcinogénesis. La proteína E7 también conduce a un aumento de la inducción de p16^{INK4a} ⁽¹⁰⁻¹²⁾.

La patogénesis del carcinoma de cabeza y cuello no solo está asociada al VPH sino se enfoca la adquisición de seis habilidades fundamentales por parte de las células neoplásicas: autosuficiencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, mantenimiento de la angiogénesis, y capacidad de invadir los tejidos y producir metástasis. Estos comportamientos no son independientes uno del otro y son resultado de un complejo proceso de alteraciones genéticas en múltiples etapas desde las lesiones pre-malignas hasta el carcinoma ⁽¹¹⁾.

El p16 (INK4a) es un gen supresor que modula la proliferación celular. Se localiza en la región 21 del brazo corto del cromosoma 9 y es un potente inhibidor del complejo ciclina D1/cdk4. Este efecto oncogénico de p16 (INK4a) depende de la inhibición de CDK4 / CDK6 en el cáncer células donde se inactiva Rb, cuya inactivación por la proteína E7 sensibiliza a las células a la apoptosis dependiente de p53, pero la proteína E6 inhibe las funciones proapoptóticas de p53. E6 se une directamente a un asociado-E6 proteína (E6-AP), una ubiquitina-ligasa específica para la degradación de p53 ⁽¹⁻⁵⁾.

E6 y E7 también pueden inducir daño al ADN y aumentar la frecuencia de integración de ADN extraño en el genoma del huésped. La proteína E7 se une a Rb, dando lugar a la sobreexpresión de la p16 (INK4a) gen supresor de tumor en células tumorales infectadas por el VPH. Dicha sobreexpresión por sí sola no es suficiente para identificar con precisión la infección por VPH en los carcinomas de células escamosas en cabeza

y cuello ⁽¹⁸⁾.

Por lo tanto, los marcadores de proliferación celular, como el Ki 67 pueden ser útiles en la valoración del tipo y grado de las lesiones pre-malignas orales. Así, los cambios en la capacidad proliferativa de las lesiones pre-malignas orales pueden revelar los cambios pre neoplásicos e indicar su potencial de transformación maligna.

MÉTODO

Se identificaron un total de 20 casos de lesiones intra-epiteliales localizadas en la mucosa de cabeza y cuello con los diagnósticos de papilomatosis, displasia o neoplasia intraepitelial, atendidos en el servicio de cabeza y cuello en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”, entre enero de 2005 hasta diciembre de 2015. Se utilizaron como criterios de inclusión la disponibilidad de los bloques de parafina y la disponibilidad de la información clínica relacionada con la evolución de los pacientes.

CONSTRUCCIÓN DE MATRIZ DE TEJIDO (MICROARRAY)

De los bloques de parafina seleccionados, se obtuvieron secciones histológicas de 4 µm de espesor que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionaron cuidadosamente las zonas con tumor, marcando esas mismas áreas en el bloque de parafina.

Se prepararon los bloques receptores de un tamaño aproximado de 5 cm x 4 cm. Cada uno de estos bloques donantes se dividió a la mitad para poseer un duplicado de cada caso. En cada fragmento se seleccionaron dos zonas diferentes en el bloque de tejido donante. Se estableció el orden de estos bloques en una plantilla que sirvió después para su lectura en el microscopio.

En la realización del troquelado de los bloques se utilizó una aguja hueca con la cual

se extrajo un cilindro de parafina del bloque receptor dejando el espacio donde se introducen los cilindros obtenidos de los bloques donantes. Con otra aguja de menor calibre se obtuvo el cilindro con el material de la zona marcada del bloque donante que se introdujo en el bloque receptor. Los cilindros fueron introducidos de modo que quedaran al mismo nivel que el bloque de parafina para facilitar el corte de todos ellos. Al culminar el proceso de troquelado de todos los bloques, se le colocó una capa de parafina al nuevo bloque y se esperó 60 min para que la parafina se solidificara y la superficie se alisara.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron cortes histológicos de 2 µm en un micrótomo y cada uno fue colocado en láminas portaobjetos tratadas previamente con poly-L-lisina y secadas durante 45 min a 70°C en estufa, para evitar el desprendimiento de los cortes.

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos, mediante la técnica de avidina-biotina peroxidasa (ABC), después de desparafinación y tratamiento de los tejidos con soluciones recuperadoras de epitopes utilizando vaporizador, los cortes histológicos fueron incubados con el siguiente anticuerpo monoclonal: p16INK4a y el índice de proliferación celular Ki67. Se utilizaron controles positivos adecuados para establecer la veracidad de las reacciones.

ANÁLISIS DEL RESULTADO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La cuantificación de la proporción de p16 se realizó mediante la observación de las láminas con criterios de todo o nada, es decir positivo o negativo, cuando se identificó la coloración marrón dorada en el núcleo y el citoplasma de las células. La cuantificación del Ki 67 se realizó mediante la observación de las láminas y conteo porcentual de las células, considerándose positivas aquellas con un color marrón dorado

nuclear a la técnica. Se expresó en porcentaje.

Los datos obtenidos se sistematizaron en Microsoft Excel® y fueron analizados a partir del procesador estadístico *Statgraphics Plus* 5.1. Se relacionó la expresión de p16 y las demás variables en estudio mediante estadística descriptiva bivariada a partir del coeficiente de correlación de *Pearson* o *Spearman*. Adoptando como nivel de significancia estadística valores de P inferiores a 0,05.

RESULTADOS

De los 20 pacientes identificados en los cuales se dispuso de los bloques de parafina, 62 % fueron del sexo femenino y el 38 % del sexo masculino, con un rango de edad que osciló entre los 17 a los 73 años, un promedio de 54,2 con una desviación standard de 16,1 (Cuadro 1). Clínicamente

todos los pacientes fueron diagnosticados en el mismo año de inicio de la clínica y el sitio más común fue la lengua (Figura 1). El diagnóstico histológico más frecuente fue de papilomatosis, seguido por hiperplasia escamosa.

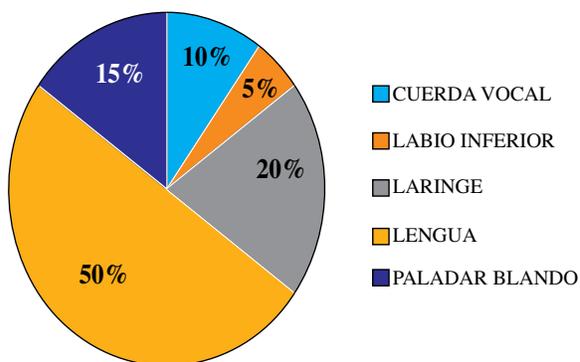


Figura 1. Localización de las lesiones intraepiteliales de cabeza y cuello. IOMPC 2005-2015.

Cuadro 1

#	Sexo	Edad	Ubicación	Histología
1	Masculino	75	Lengua	Papilomatosis
2	Masculino	50	Paladar blando	Hiperplasia
3	Masculino	47	Lengua	Hiperplasia
4	Femenino	69	Lengua	Papilomatosis
5	Femenino	69	Lengua	Papilomatosis
6	Femenino	46	Lengua	Hiperplasia
7	Femenino	63	Lengua	Hiperplasia
8	Femenino	35	Laringe	Nódulo laríngeo
9	Masculino	46	Paladar blando	Papilomatosis
10	Femenino	63	Paladar blando	Papilomatosis
11	Femenino	38	Cuerda vocal	Hiperplasia
12	Masculino	32	Labio inferior	Hiperplasia
13	Femenino	56	Lengua	Papilomatosis
14	Masculino	72	Laringe	Displasia
15	Femenino	56	Lengua	Hiperplasia
16	Femenino	25	Laringe	Papilomatosis
17	Femenino	50	Lengua	Papilomatosis
18	Masculino	60	Laringe	Papilomatosis
19	Femenino	73	Cuerda vocal	Displasia
20	Masculino	59	Lengua	Papilomatosis

Dentro de los factores de riesgo encontrados, el hábito tabáquico acentuado entre 4 cigarrillos y 2 cajas diarias estuvo presente en 60 % de los pacientes, 7 del sexo femenino y 5 del sexo masculino.

El cuadro clínico estuvo caracterizado por lesión dolorosa, con aumento de volumen de la misma y sintomatología de disfagia y disfonía. El diagnóstico se realizó principalmente por examen físico, exploración de cavidad orofaríngea, realización de laringoscopia indirecta en la consulta y corroborado por toma de biopsia de las lesiones sospechosas; la mayoría biopsias

excisionales y por nasofibrolaringoscopia.

Durante su evolución clínica, el 13 %⁽⁴⁾ de los pacientes de los 20 pacientes estudiados, progresaron a carcinoma epidermoide infiltrante y un paciente presentó un adenocarcinoma adenoideo quístico, este tenía el diagnóstico de una lesión papilar benigna de paladar blando. De los 4 pacientes con carcinoma epidermoide, 3 eran del sexo femenino y uno masculino, con edades que oscilaban entre 50 y 75 años. El diagnóstico de carcinoma epidermoide fue realizado entre 1 mes posterior al diagnóstico de papilomatosis hasta 5 años.

Cuadro 2. Evolución clínica

#	Sexo	Edad	Ubicación	Histología	Evolución
1	Masculino	75	Lengua	Papilomatosis	Ca epidermoide
2	Masculino	46	Paladar blando	Papilomatosis	Ca adenoideo
3	Femenino	50	Lengua	Papilomatosis	Ca epidermoide
4	Femenino	56	Lengua	Papilomatosis	Ca epidermoide
5	Femenino	73	Cuerda vocal	Displasia	Ca epidermoide

La única paciente con el diagnóstico de displasia leve de cuerda vocal, era de 73 años, presentó un carcinoma epidermoide de laringe estadio I, 4 años más tarde.

Al realizar la técnica de inmunohistoquímica, se desprendieron un total de 5 cortes de las láminas, con los siguientes resultados. Un total de 13 casos fueron negativos para el p16 y 2 casos expresaron p16 en células basales, focal con una intensidad moderada, todos con el diagnóstico histológico de papilomatosis. Asimismo, de los 15 casos a quienes se les realizó el Ki 67, 2 expresaron el anticuerpo en las capas basales,

con una intensidad moderada, en un 15 % de las células evaluadas. De estos pacientes uno tenía el diagnóstico de papilomatosis y otro el diagnóstico de una displasia leve.

Los dos pacientes con el diagnóstico histológico de papilomatosis eran del sexo femenino y no hay evidencia de desarrollo de carcinoma epidermoide, en nuestra institución. Sin embargo, de los 2 pacientes con expresión de Ki 67, ambos desarrollaron carcinoma epidermoide, uno de ellos con un diagnóstico de displasia leve de cuerda vocal.

DISCUSIÓN

El CECC es aquel tumor epitelial maligno, que afecta el epitelio mucoso desde la cavidad oral, desde la superficie mucosa de los labios, faringe, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe y laringe. A pesar de localizaciones anatómicas diferentes, comparten una serie de factores de riesgo comunes. Tradicionalmente se ha asociado al hábito tabáquico y consumo de alcohol. Sin embargo, en los últimos años, se ha detectado la presencia de pacientes con evidencia de infección por VPH, capaces de desarrollar un carcinoma epidermoide. Desde el punto de vista epidemiológico, se trata de pacientes más jóvenes que en el CECC relacionado con el hábito tabáquico. Prácticamente se trata de dos enfermedades, aquellos con tumores no relacionados al VPH y los relacionados al VPH, estos últimos con un riesgo menor de mortalidad ⁽³⁻⁶⁾.

Las lesiones pre-invasoras o pre-malignas del CECC, son una serie de cambios patológicos intraepiteliales que cursan con trastornos de la maduración del epitelio, en ocasiones, muy parecidos a cambios reactivos como hiperplasia de células basales o cambios histológicos asociados a la infección por el VPH. Estas lesiones son conocidas como displasia o neoplasias intraepitelial laríngea (NIL), haciendo una analogía a lo que ocurre en el cuello uterino.

En nuestra investigación, identificamos un total de 20 pacientes, la mayoría de ellos con cambios histológicos de VPH (papilomatosis) y un paciente con una displasia de cuerda vocal. A diferencia de lo descrito en la literatura mundial, nuestros pacientes demostraron un predominio importante en el sexo femenino y con una edad significativamente mayor a lo que se describe en lesiones por VPH ⁽¹⁹⁻²¹⁾.

El p16 es una oncoproteína supresora de CDK4,6 que en numerosos estudios es interpretado como un equivalente a la

infección por el VPH. Sin embargo, en nuestra investigación, solo se demostró p16 en 2 pacientes, uno con una papilomatosis y otro con una displasia leve de cuerda vocal.

De manera semejante, solo 2 casos se identificaron expresión del índice de proliferación celular Ki 67. Ambos fueron de sexo femenino, uno desarrollo un carcinoma epidermoide de lengua y otra desarrollo un carcinoma epidermoide de laringe 5 años después.

Llama la atención el bajo índice de expresión de p16. Entre los factores que podemos postular están defectos pre analíticos como fallas en la fijación o sobreexposición al fijador, sabemos que en la mayoría de nuestras instituciones públicas o privadas no se emplea formol tamponado, otros problemas fallas en el almacenamiento de los bloques, con inadecuada preservación del material antigénico, defectos en la titulación del anticuerpo empleado, especialmente si se trata de casos con baja expresión de antígenos. Sin embargo, es importante el empleo de una prueba *gold standar*, como métodos moleculares para el diagnóstico de la infección por el VPH y además identificar si se trata de una serotipo de alto riesgo, riesgo intermedio o alto riesgo ^(23,34).

La expresión de Ki 67 en un caso de displasia leve en la capa basal de la mucosa, permite confirmar el diagnóstico histológico.

Adicionalmente, es importante recalcar que el 20 % de los pacientes con lesiones intraepiteliales o pre-invasoras desarrollaron carcinoma epidermoide infiltrante. Podemos concluir:

Las lesiones intraepiteliales más frecuentes en la mucosa de la cabeza y el cuello son las papilomatosis.

En nuestras medias estas lesiones intraepiteliales son más frecuentes en mujeres que en hombres.

El 20 % de estos pacientes desarrollaron un CECC, con predominio del sexo femenino.

El 75 % de los pacientes que desarrollaron un CECC, referían hábito tabáquico intenso.

El 13 % de los pacientes expresaron p16. El 13 % de los pacientes expresaron Ki67.

Basado en estos resultados, a pesar de lo pequeña de la muestra, permite inferir que probablemente el VPH no sea un agente causal de CECC como en Europa o en EE.UU.

Recomendamos en este caso hacer diagnóstico de infección por VPH, mediante técnica de PCR, *Western blot* o captura híbrida, para poder establecer el valor diagnóstico del p16 en las lesiones intraepiteliales mucosas de cabeza y cuello.

REFERENCIAS

1. Chai R, Lambie D, Mukesh V, Chamindie PA. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. *Cancer Medicine*. 2015;4(4):596-607.
2. Sudbø I, Kildal W, Johannessen AC, Koppang HS, Sudbø A, Danielsen HE, et al. Gross genomic aberrations in precancers: Clinical implications of a long-term follow-up study in oral erythroplakias. *J Clin Oncol*. 2002;20:456-462.
3. Gültekin S, Sengüven B, Klusmann JP, Dienes HP. p16ink 4A and Ki-67 expression in human papilloma virus related head and neck mucosal lesions. Disponible en: URL: <http://www.researchgate.net/publication/272889056>.
4. Zárate CE. The updated WHO Head and Neck Tumors Classification (2005). Epithelial precursor lesions and tumors of the larynx, hypopharynx and trachea. *Rev Esp Patol*. 2007;40(1):3-10.
5. Gutiérrez C, Hernández L, Sánchez VJ. Lesiones pre-neoplásicas de la cavidad oral: Revisión bibliográfica últimos 12 meses. Disponible en: URL: <http://biopat.cs.urjc.es/conganat>.
6. Sereno M, Espinosa E, Castelo B, González M. Biología Molecular de los cánceres de cabeza y cuello. Servicio de Oncología Médica. Hospital La Paz. Madrid. España. *Rev Oncol*. 2003;5(9):500-510.
7. Jiménez YR, Michel R, Granado C. Prognostic factors in epidermoid carcinoma of head and neck. *Act Médica del Centro*. 2013;7(4):2013.
8. López-Durán M, Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Díez-Pérez R, Bascones-Martínez A. Aplicación de las técnicas de biología molecular en oncología oral. *Av. Odontoestomatol*. 2010;26(4):189-196.
9. Sidransky D. Cancer of the head and Neck. En: Devita V, Hellman S, Rosenberg S, editores. *Principles and Practice of Oncology*. 6ª edición. Filadelfia: Lippincott Raven; 2001.
10. Lippman SM, Spitz MR, Huber MH, Hong WK. Strategies for chemoprevention study of premalignancy and second primary tumors in the head and neck. *Curr Opin Oncol*. 1995;7:234-241.
11. Lotan R, Xu XC, Lippman SM, Ro JY, Lee JS, Lee JJ, et al. Suppression of retinoic acid receptor beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N Engl J Med*. 1995;332:1405-1410.
12. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res*. 1993;53:4477-4480.
13. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors. *Nat Genet*. 1995;11:210-212.
14. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16/CDKN2/MTS-1/INK4A inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56:3630-3633.
15. Jares P, Fernández PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res*. 1994;54:4813-4817.
16. Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*. 2000;6:357-362.
17. Khattab J, Urba S. Head and Neck Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999;13(4):753-768.
18. Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shah K, Sidransky D, Westra WH. Immunohistochemically detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: Correlation with p53 gene alterations. *Hum Pathol*. 1999;30:1221-1225.
19. Bryne M, Boysen M, Alfes CG, Abeler VM, Sudbo J, Nesland JM, et al. The invasive front of carcinomas. The important area of tumor prognosis? *Anti Cancer Res*. 1998;18:4747-4764.
20. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hunter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, et al, editores. *American Joint Committee on cancer (AJCC)*. *AJCC Cancer*

- staging manual. 5ª edición. Filadelfia: JB. Lippincott; 1997.p.24-30.
21. Sciuba JJ. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. *J Am Dent Assoc.* 2001;32 (Suppl):S12- 18.
 22. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997;33:302-212.
 23. Bungard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer Oral Oncol.* 1994;30B(5)323-328.
 24. Zhang SY, Kleinszanto AJP, Sauter ER, Shafarenko M, Mitsunaga S, Nobori T, et al. Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res.* 1994;54:5050-5053.
 25. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors. *Nat Genet.* 1995;11:210-212.
 26. Reed A, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16CDKN2/MTS-1/INK4A inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56:3630-3633.
 27. Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan YH, Clayman G, et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene.* 1997;14:1799-1803.
 28. Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, et al. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res.* 1995;55:2995-2997.
 29. Liggett WH Jr, Sewell DA, Rocco J, Ahrendt SA, Koch W, Sidransky D, et al. p16 and p16 are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 1996;56:4119-4123.
 30. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:709-720.
 31. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, et al. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: Clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res.* 1996;2:755-762.
 32. Genden E. 5 Things to know about HPV-related throat cancer. Disponible en: URL: <http://www.everydayhealth.com/columns/health-answers/5-things-to-know-about-hpv-related-throat-cancer/>